

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences
Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Support pédagogique destiné aux étudiants 2^{ém} année Licence Sciences Biologiques

Présenté par :
M^r CHERIF Nadjib

Travaux Dirigés – Microbiologie Générale

Année Universitaire : 2019-2020

Sommaire

Partie I : Technique de stérilisation en bactériologie

I. Stérilisation par les méthodes physiques	1
I.1. Stérilisation par la chaleur sèche	1
I.2. Stérilisation par la chaleur humide	4
I.3 Stérilisation par filtration	6
I.4. Stérilisation par radiations	7
I.5. Stérilisation par radiations	8
II. Stérilisation par les agents chimiques	9
II.1. Les antiseptiques	9
II.2. Les désinfectants	10
Exercices	11

Partie II : La multiplication et la croissance bactérienne

I. Mesure de la croissance bactérienne	14
II. Cinétique de la croissance	15
Exercices.....	17
III. Les Facteurs environnementaux affectant la croissance des microorganismes	21
Exercices.....	24

Partie III : Identification Bactérienne

I. Identification biochimique des bactéries	33
II. Identification génotypique des bactéries	38
Exercice.....	40

Partie IV : Antibiogramme

Test de diffusion sur gélose	47
Exercices.....	49
Références bibliographique	52

Partie I

Techniques de stérilisation en bactériologie

La stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés. Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés : on utilise essentiellement des méthodes physiques.

Dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques ou chimiques). Il faut opposer la stérilisation qui est la destruction totale des germes, à la désinfection qui est une destruction plus grossière.

Définition

La stérilisation est une opération qui vise à détruire tous les micro-organismes d'un objet de façon durable. Elle est notamment utilisée dans la cuisine, la médecine et l'industrie pharmaceutique (médicaments). L'objectif de la stérilisation est double : contrôler les micro-organismes et prévenir une éventuelle contamination.

I. Stérilisation par les méthodes physiques

I.1. Stérilisation par la chaleur sèche

La chaleur sèche tue les micro-organismes en combinant l'oxydation des protéines, par l'oxygène de l'air, et l'enlèvement de l'eau, indispensable au maintien de la structure protéique.

I.1.1. Le flambage :

Une technique rapide et complète du petit matériel, utilisée dans les laboratoires de bactériologie, ainsi que dans les hôpitaux et cliniques. Elle s'applique au traitement des surfaces aisément accessibles à la flamme, et en aucun cas à la stérilisation des objets carbonisables.

Au laboratoire de microbiologie, le flambage est le passage dans la flamme de bec BUNSEN de la surface de matériel non inflammable. Avec cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur et pipettes graduées, col des tubes à essai, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers et flacons divers, sont stérilisés. L'échauffement de l'air autour de la flamme assure une zone de convection de 10-15 cm autour du bec dans laquelle l'air est stérile. C'est dans cette zone qu'il faut se situer pour travailler les protocoles de microbiologie.

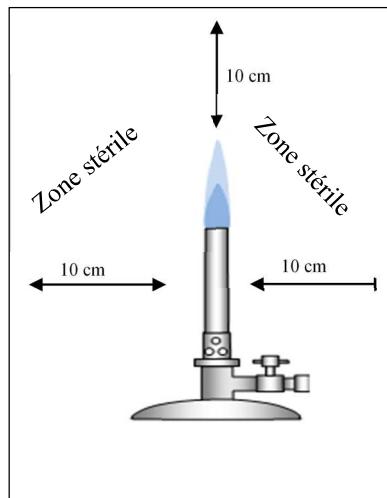


Figure 1 : Stérilisation de l'air par flambage

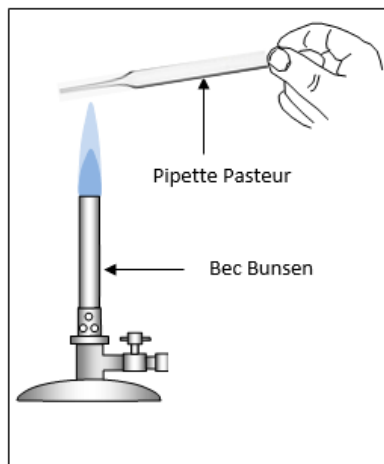


Figure 2 : Stérilisation d'une verrerie par flambage

I.1.2. Le four Pasteur (Poupinel)

Le stérilisateur de type Poupinel ressemble à un four ménager, non vitré et hermétique, muni de grilles permettant d'y déposer les paquets comme représenté par la

Figure 3. La chaleur sèche de cet appareil ne peut s'utiliser que sur les matériaux supportant des températures élevées, comme les instruments métalliques, la verrerie, et éventuellement le papier et des tissus.

La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage à des températures variantes (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Couples Temps-Température utilisables au four Pasteur

Température	125°C	140°C	140°C	150°C	160°C	170°C	180°C
Temps	24h	4h	3h	2h30mn	2h	1h	30mn



Figure 3 : Four Pasteur

I.1.3. Flambage par l'alcool :

Le flambage consiste à verser de l'alcool dans un plateau métallique où sont disposés les instruments, et à y mettre le feu. Cette méthode est inefficace, la durée est nettement inférieure au temps nécessaire pour avoir une vraie stérilisation. De plus, il se forme une mince couche d'air entre la flamme et la surface de l'instrument, qui suffit à

protéger les micro-organismes présents. Cette technique peut être dangereuse, surtout si elle est effectuée à proximité de produits inflammables.

I.2. Stérilisation par la chaleur humide

I.2.1. l'autoclavage

La stérilisation par la chaleur humide aboutit à une hydrolyse des protéines bactériennes par action conjuguée de la chaleur, de l'humidité, et d'une pression élevée, qui permet d'atteindre des températures de vapeur d'eau saturante plus hautes qu'à pression atmosphérique. L'autoclave, enceinte dans laquelle a lieu cette stérilisation, doit donc être capable de supporter de fortes pressions. Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie.

Trois paramètres sont à prendre en compte pour la stérilisation à l'autoclave :

- Pression.
- Température.
- Temps de stérilisation.

Dans une enceinte totalement close, l'augmentation de la température de la vapeur d'eau saturée entraîne également une augmentation de la pression. Autrement dit, à une pression donnée, il n'existe qu'une seule température possible pour la vapeur d'eau saturée (**Tableau2**).

Tableau 2 : Couples Temps-Température utilisable en chaleur humide.

	Instrument emballé			Instrument non emballé	
Température	121 °C	126 °C	134 °C	121 °C	131°C
Temps	20 mn	15 mn	5 mn	15 mn	3 mn

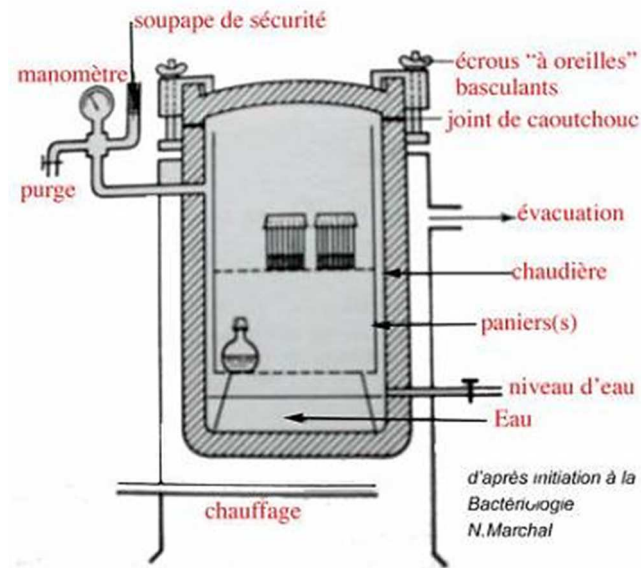


Figure 4 : Schéma d'un autoclave microbiologique.

I.2.2. La Pasteurisation

La pasteurisation est un traitement thermique à des températures comprises entre 60 et 100°C ayant pour but de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes non sporulés et de réduire significativement la flore végétative présente dans un produit.

La pasteurisation est un procédé consistant à chauffer des produits alimentaires liquides tels que le lait, les jus, les boissons pendant quelques minutes ou secondes à une température la plus basse possible, entre 63 et 95° C, puis à le refroidir de 4 à 14°C de manière à détruire les germes nocifs qui pourraient être présents dans le lait, et réduire le nombre de microorganismes nullement dangereux pour la santé.

Tableau 3 : Les différents barèmes de pasteurisation du lait.

Température	63 °C	72°C	89°C	90°C	94°C	96°C	100°C
Temps	30 mn	15 sec	1 sec	0.5 sec	0.1 sec	0.05 sec	0.01 sec

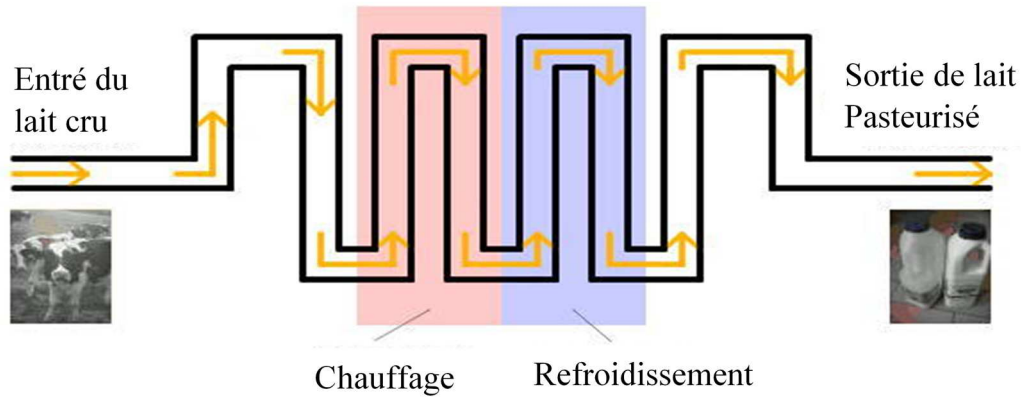


Figure 5 : Schéma de la Pasteurisation.

I.2.3. La Tyndallisation

Actuellement, la tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1h. à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant sérum, œuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration.

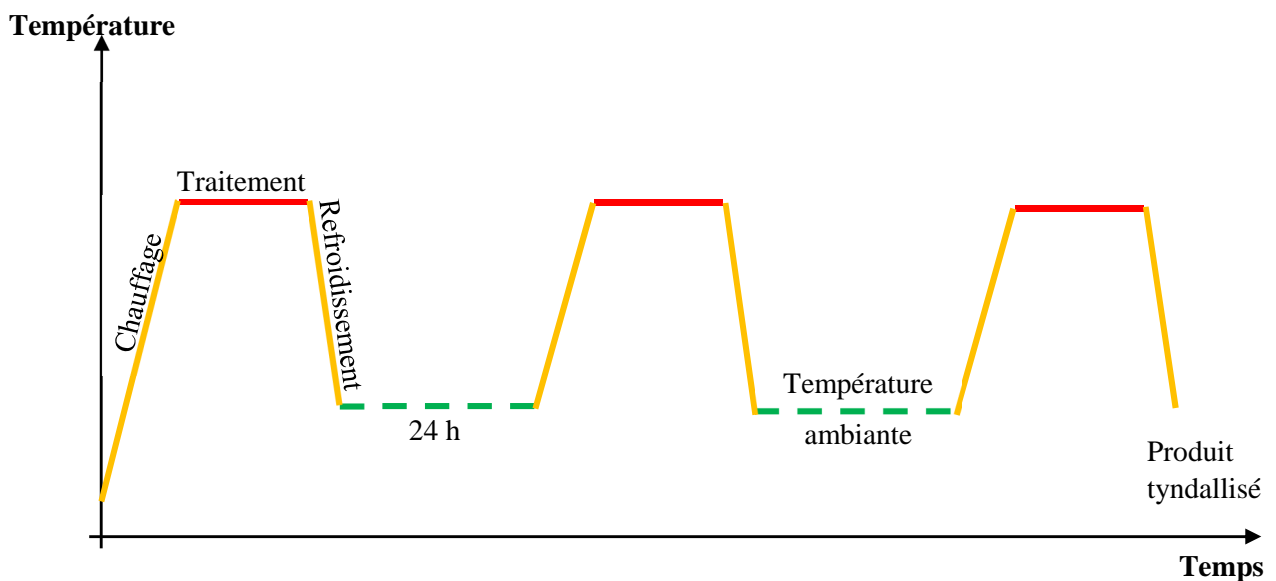


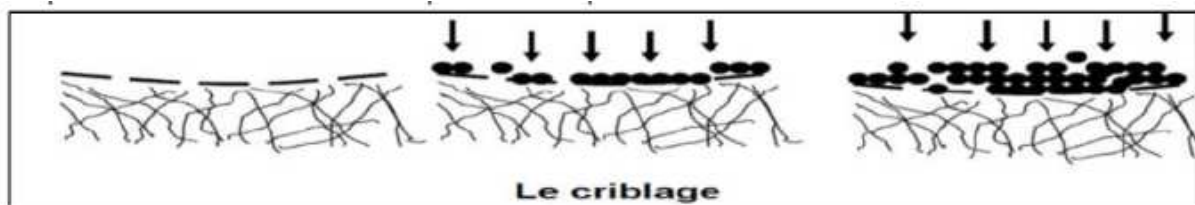
Figure 6 : Les étapes de la Tyndallisation

I.3. Stérilisation par filtration

C'est un procédé qui ne permettant pas de stériliser dans l'emballage définitif et le seul procédé qui élimine les microorganismes au lieu de les détruire. Il est basé sur la rétention des micro-organismes et particules par un réseau filtrant. Cette rétention se fait par l'un des deux mécanismes suivants ou par la combinaison des deux :

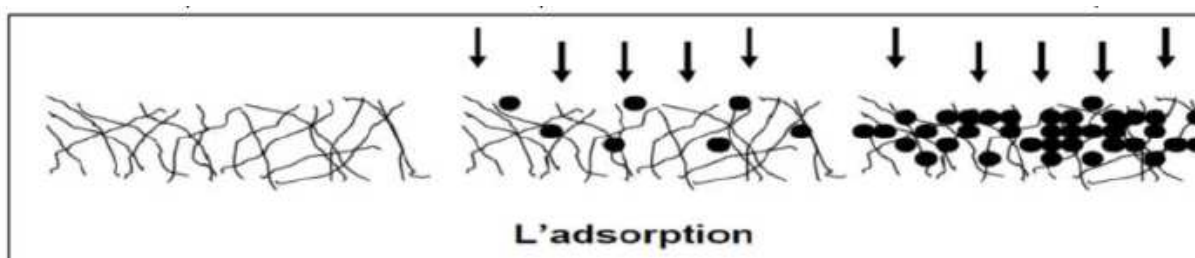
I.3.1. Le criblage

Phénomène mécanique, le filtre retient toutes les particules dont le diamètre est supérieur au diamètre des pores. On parle de filtre écran ou de filtre membrane.



I.3.2. L'adsorption (ou filtration en profondeur)

Phénomène physique, ce mécanisme consiste à retenir à l'intérieur du réseau poreux du filtre des particules dont la taille peut être inférieure au diamètre des pores.



Ce mode de stérilisation est applicable aux fluides qui ne supportent pas un traitement stérilisant final par l'un des autres procédés en raison de leur sensibilité à la chaleur, l'eau, aux gaz ou aux radiations ionisantes.

I.4. Stérilisation par radiations

Les radiations sont un moyen sûr et efficace de stérilisation des dispositifs de laboratoires, et ne nécessitent le contrôle que d'un seul paramètre, la dose de radiations. Elles sont très utilisées à cette fin en milieu industriel, pour la préparation de divers matériaux qui ne supportent pas les autres moyens de stérilisation, physiques ou chimiques.

Les rayonnements UV sont très bactéricides mais peu pénétrants et sont utilisés pour une stérilisation superficielle d'instruments, des surfaces et l'atmosphère des enceintes stériles, et maintenir la stérilité de l'eau distillée conservée dans des cuves de stockage. Ils sont très efficaces mais ils sont arrêtés par le moindre obstacle et ils peuvent s'avérer très dangereux (lésions oculaires graves).

D'autres radiations (rayons X, et γ), stérilisation par ionisation peu utilisées, peuvent cependant servir pour la stérilisation industrielle des matériaux en matière plastique comme les boîtes de Pétri.

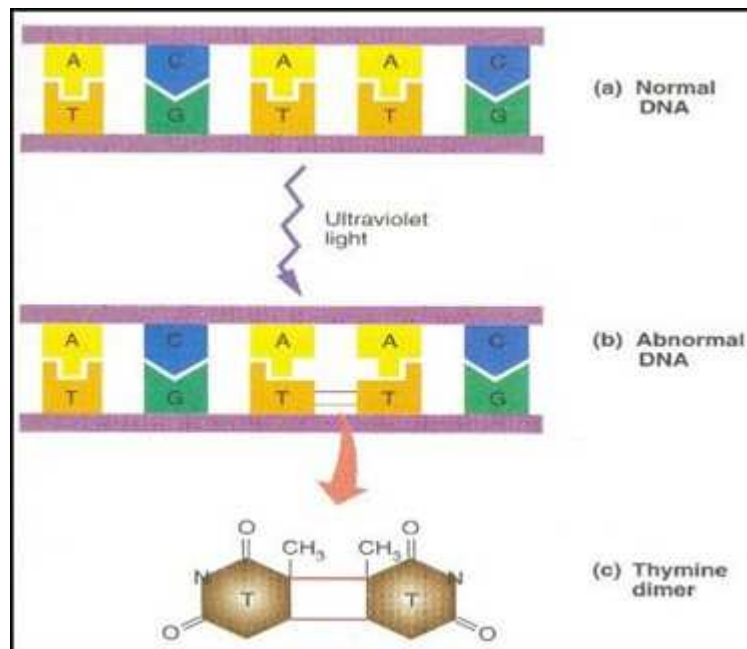


Figure 7 : Effet des Rayon UV sur la molécule d'ADN.

II. Stérilisation par les agents chimiques

II.1. Les antiseptiques

L'antisepsie est l'action au résultat momentané permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération.

- **Définition des antiseptiques**

Sont des substances anti-bactériennes non spécifiques agissant globalement et rapidement sur les bactéries, virus, champignons et spores, ils sont réservés à l'usage externe car il est toxique par voie générale. Pour une souche donnée, l'antiseptique peut être :

- Bactéricide : destruction des bactéries
- Bactériostatique : inhibition de la multiplication des bactéries
- Fongicide : destruction des champignons
- Fongistatique : inhibition de la multiplication des champignons
- Virucide : destruction des virus
- Sporicide : destruction des spores bactériennes

Tableau 4 : Exemples de quelques antiseptiques les plus utilisés.

SPECIALITES	INDICATIONS
LES POLYVIDONES IODES (PVPI) OU HALLOGENES IODES	
PVPI scrub Savon antiseptique	- Désinfection des mains - Douche pré-opératoire - Détergence peau saine, peau lésée, muqueuses - Antisepsie peau saine, peau lésée et muqueuses
PVPI alcoolique	- Antisepsie peau saine - Manipulations (robinets rampes, sac à urine.)
PVPI ORL	-Antisepsie de la sphère ORL

LES BIGUANIDES (CHLORHEXIDINE)	
Savon antiseptique	<ul style="list-style-type: none"> - Désinfection des mains - Douche pré-opératoire - Détersion peau saine peau lésée
Solution alcoolique	<ul style="list-style-type: none"> - Antiseptie peau saine en 1 temps - Antiseptie peau saine - Manipulations (robinets rampes, vidange de sac à urine.)
chlorhexidine + chlorure de benzalkonium +alcool benzylique	<ul style="list-style-type: none"> - Produit de référence pour l'enfant de moins de un mois - Antiseptie peau saine et peau lésée
LES ALCOOLS (ETHANOL)	
Alcool modifié 70°	<ul style="list-style-type: none"> - Antiseptie peau saine en 1 temps - Manipulations (robinets rampes, vidange de sac à urine.)
Les CHLORES	
Dakin ou autre	<ul style="list-style-type: none"> -Antiseptie peau saine peau lésée et muqueuses - Préconisé sur les muqueuses en cas d'intolérance à l'iode - Irrigations - Avec précaution pour l'antiseptie des cavités internes

II.2. Les désinfectants

La désinfection est une opération au résultat momentané, qui permet d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par les milieux inertes contaminés en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. Lors d'une désinfection, il n'y a pas de conditionnement de l'objet, et dès la fin du traitement une recolonisation de l'objet survient. Par définition, une désinfection vise à réduire une population de micro-organismes, mais pas nécessairement à la supprimer en totalité.

- **Les désinfectants gazeux**

Les vapeurs d'une solution chauffée de formol sont utilisées pour désinfecter les pièces et les étuves. L'oxyde d'éthylène est utilisé dans l'industrie pour la désinfection de certains matériels en plastique à usage unique. Dans les centres hospitaliers, une enceinte est réservée à ce type de désinfection pour le matériel d'intubation par exemple, qui ne supporte pas l'échauffement

Tableau 5 : Résumé des activités de quelques désinfectants

	Staphylococcus C. difficile Streptococcus Enterococcus Listeria	Salmonella E. coli Pseudomonas	Tuberculose (Bacilles)	Virus de la gastroentérite	Virus de grippe HIV Varicelle- Zona Rougeole rubéole	Moisissures levures
Hypochlorite de sodium (eau de Javel)	+	+	+	+	+	+
Peroxyde d'hydrogène activé	+	+	+	+	+	+
Phénols	+	+	+/-	+/-	+	+/-
Ammoniums quaternaires	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+

Exercice

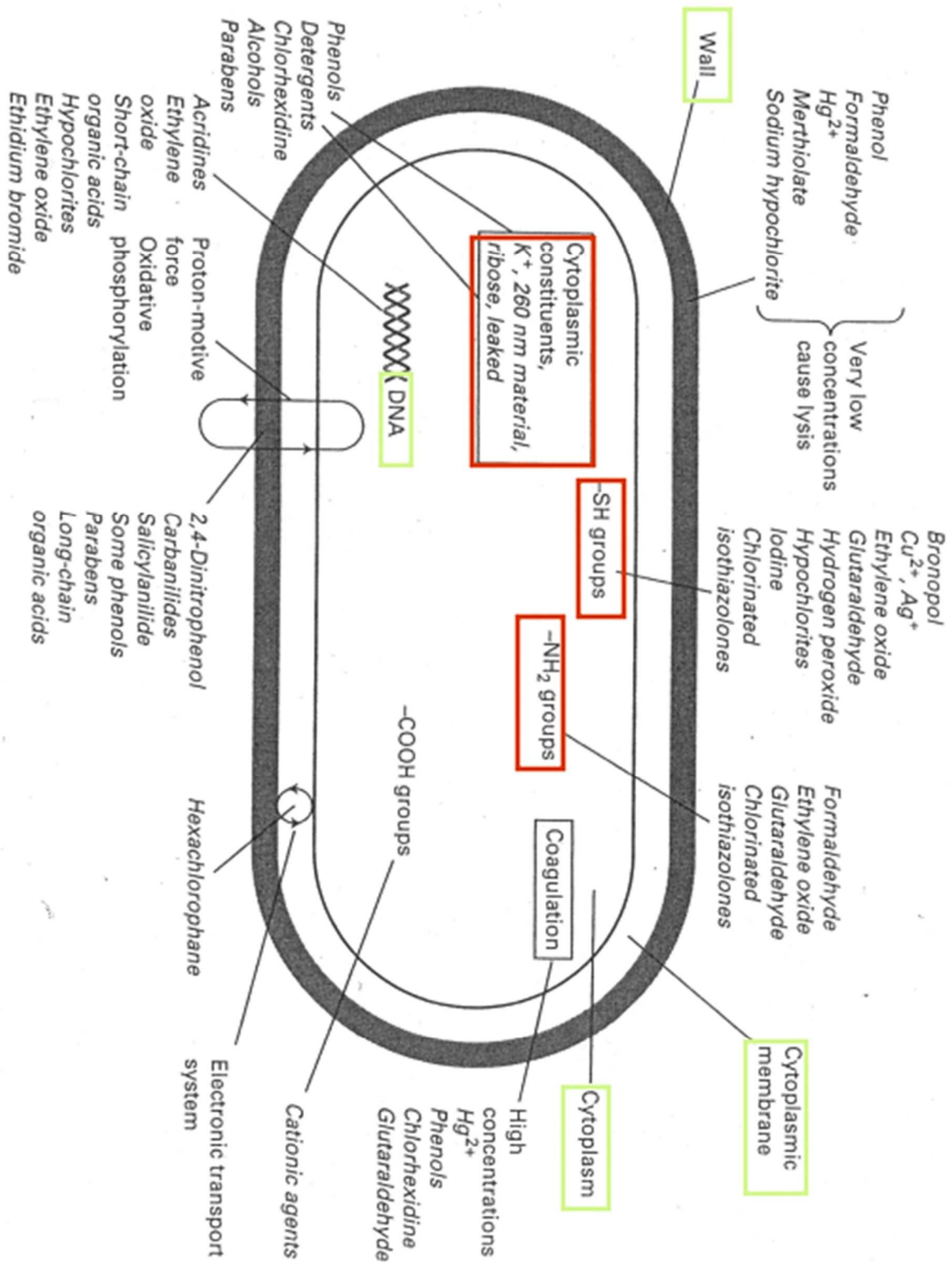
Citez des exemples des désinfectants et leurs modes d'action sur les microorganismes.

Corrigé

Classes	Exemples	Cible et mode d'action	Remarques
ALCOOLS	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	présence d'eau nécessaire à l'activité (utilisation d'alcool) / ↓ activité par matières biologiques
ALDEHYDES	Formaldehyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	↓ activité par matières biologiques
AMMONIUMS QUATERNAIRES	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule	↓ activité par matières biologiques, savons et oxydants
BIGUANIDES	Chlorhexidine	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol	↓ activité par matières biologiques et savons
HALOGÈNES CHLORES ET IODES	Hypochlorite de sodium (Javel, Dakin) PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)	↓ activité par matières biologiques et savons / dégradation par rayons UV
OXYDANTS	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN	↓ activité par matières biologiques

Tableau 6 : exemples des désinfectants et leurs modes d'action sur les microorganismes

Figure 8 : exemples des désinfectants et leurs modes d'action sur les microorganismes



Partie II

La multiplication et la croissance bactérienne

Chez les bactéries la croissance peut ne se traduire pas que par une augmentation de volume des cellules, mais elle conduit principalement à une augmentation du nombre de cellules.

Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants et substances élémentaires ou matériaux constitutifs de la cellule.

La croissance bactérienne peut s'exprimer :

- 1 – Par augmentation de la biomasse de la population.
- 2 – Par l'accroissement d'activités métaboliques.
- 3 – Par l'augmentation du nombre d'individus.

I. Mesure de la croissance bactérienne

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance bactérienne :

- **Dénombrement des bactéries après culture**, d'où une série de dilutions est réalisée à partir des échantillons, puisensemencée en surface ou en profondeur sur la gélose, le nombre bactérien unité formats colonie UFC se traduit par le nombre des colonies obtenues multiplié fois le facteur de dilution.
- **Mesure de la biomasse** : c'est le poids de la matière sèche obtenu par une simple pesée après séparation des cellules du milieu de culture (centrifugation, filtration fine), puis lavage et séchage de ces cellules.
- **Méthodes de numération** : à partir d'un volume connu d'une suspension bactérienne on peut faire une numération totale des cellules au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez.
- **La mesure de la turbidimétrie** : la spectrophotométrie (La mesure de la densité optique) est utilisée pour mesurer la turbidimétrie, une technique plus simple, plus rapide et plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible).

II. Cinétique de la croissance.

II.1. Courbe de croissance.

Dans une culture discontinue où la croissance n'est pas synchrone et où les nutriments s'épuisent avec le temps, la croissance suit une courbe à **04 phases**. La phase de **latence**, la phase de **croissance exponentielle**, la phase **stationnaire** et la phase de **déclin**. La croissance bactérienne est très régulée et propre à chaque espèce, elle est caractérisé par des paramètres qui identifient les différentes étapes sur une courbe de croissance.

- **Temps de génération « g »** : c'est le temps nécessaire pour que la population double ou le temps qui sépare deux divisions successives $g = \Delta t / n$ (n : est le nombre de division)
- **Taux de croissance « μ » (vitesse)** : c'est le nombre de division par unité de temps $\mu = n / \Delta t = 1 / g$ (t : est le temps)

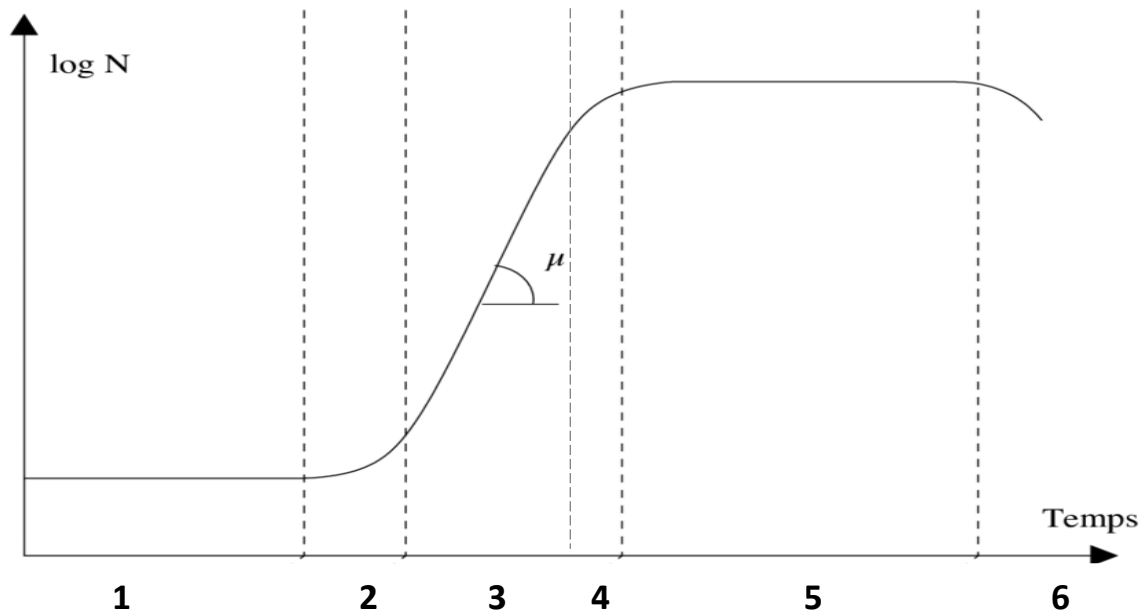


Figure 9 : Courbe générale de croissance bactérienne.

On distingue quatre phases principales et deux autres intermédiaires :

1. Phase de latence :

Le taux de croissance est nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat.

Cette phase est absente si la souche repiquée sur un milieu identique au précédent.

2. Phase d'accélération :

Il se produit une augmentation de la vitesse de croissance, le passage de $\mu = 0$ au $\mu = x$.

3. Phase exponentielle :

Le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \max$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

4. Phase de ralentissement :

La vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

5. Phase stationnaire :

Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Les produits toxiques s'accumulent et le pH change. Le nombre de cellules ne varie plus. C'est une phase de **croissance cryptique**, où des cellules se nourrissent du contenu libéré par des cellules mortes.

6. Phase de déclin :

Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

Exercice

Dans une erlenmeyer, 200ml d'un milieu de fermentation contenant le glucose et le lactose comme sources de carbone a étéensemencé avec 2 ml d'une suspension bactérienne pure de 18 heures, puis incubé à une température de 30°C durant 285 minutes.

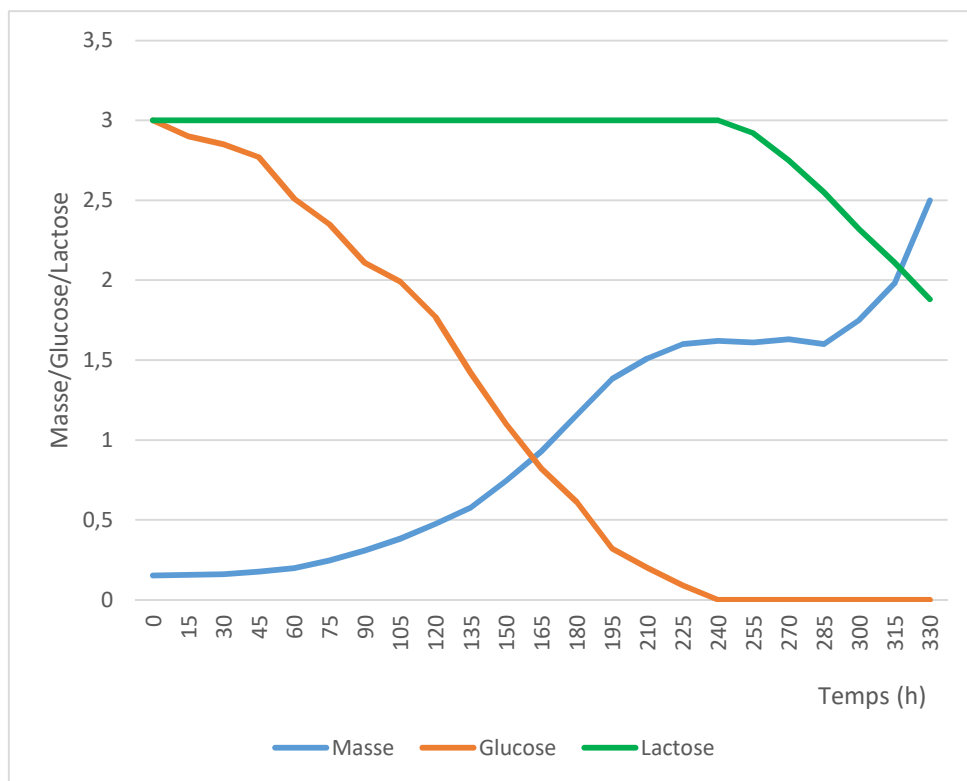
A chaque période de temps, 2 ml du milieu est prélevé pour évaluer la masse bactérienne, et la consommation des nutriments ; les résultats sont mentionnés sur le tableau suivant :

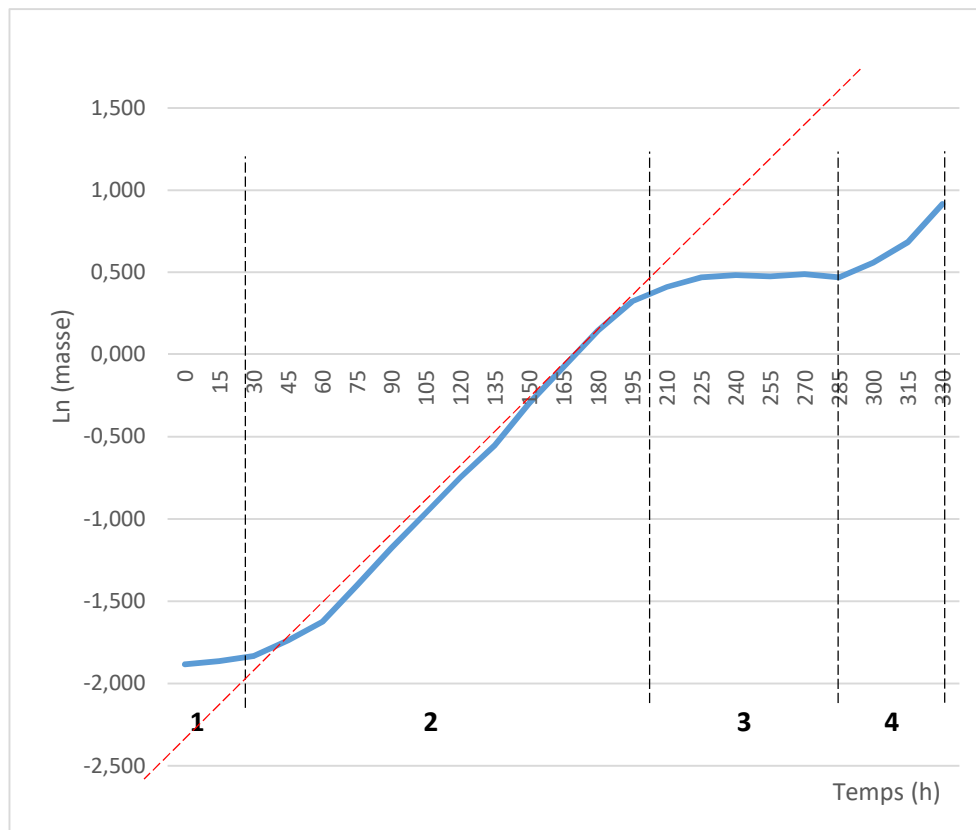
Temps (mn)	Masse Unité	Ln (masse)	Glucose (g/l)	Lactose (g/l)
0	0,152	-1,884	3	3
15	0,155	-1,864	2,9	3
30	0,16	-1,833	2,85	3
45	0,176	-1,737	2,77	3
60	0,197	-1,625	2,51	3
75	0,246	-1,402	2,35	3
90	0,308	-1,178	2,11	3
105	0,382	-0,962	1,99	3
120	0,474	-0,747	1,77	3
135	0,576	-0,552	1,42	3
150	0,744	-0,296	1,1	3
165	0,928	-0,075	0,82	3
180	1,158	0,147	0,61	3
195	1,381	0,323	0,32	3
210	1,51	0,412	0,2	3
225	1,6	0,470	0,09	3
240	1,62	0,482	0	3
255	1,61	0,476	0	2,92
270	1,63	0,489	0	2,75
285	1,6	0,470	0	2,55
300	1,75	0,560	0	2,32
315	1,98	0,683	0	2,11
330	2,5	0,916	0	1,88

1. Dessinez dans le même graphe les courbes qui représentent : la masse (unité), la consommation du glucose et du lactose en fonction du temps.
2. Dessinez dans un autre graphe la courbe qui représente \ln (masse) en fonction de temps.
3. Limitez les différentes phases de croissance sur le deuxième graphe en expliquant la phase de la période [285-330]
4. Comparez les deux courbes de la masse et de \ln (masse) en fonction de temps.
5. Interprétez le premier graphe (consommation des nutriments).
6. Calculer le taux de croissance et le temps de génération.

Corrigé

1. **Figure 10** : Le graphe de la masse bactérienne et la consommation du glucose et du lactose en fonction de temps.



2. **Figure 11** : Le graphe de Ln (masse) en fonction de temps.

3. On distingue 4 différentes phases sur cette courbe :

- La phase 1 : latence
- La phase 2 : exponentielle
- La phase 3 : stationnaire
- La phase 4 : deuxième exponentielle (Diauxie).

La quatrième phase de la période [285-330] a été déclenchée après la phase stationnaire où la source de carbone glucose est épuisée, ce qui induit la bactérie à rechercher une autre source de carbone qui est le lactose, et s'adapte à sa dégradation, donc on peut dire que la période qui précède la 2ème phase exponentielle est une deuxième phase de latence, après la synthèse du bagage enzymatique (Beta-galactosidase) la vitesse de croissance arrive de nouveau à leur maximal.

4. Grâce au tracé $\text{Ln}[X]=f(t)$ on visualise de façon simple et claire la phase exponentielle. On peut dire qu'elle est précédée par une phase de latence-adaptation qui dure environ 45 minutes. La latence-adaptation correspond même exactement à un décalage de 42 minutes à la phase exponentielle si elle avait commencé dès le temps zéro (42 minutes c'est la distance, en temps, qui sépare les 2 droites rouges parallèles sur le graphique).
5. On note une accélération de la consommation du glucose dès que la phase exponentielle I est déclenchée, jusqu'à son épuisement à 240 min.

La consommation du lactose n'a commencé qu'aux 240 min ce qui explique que la bactérie utilise la source la plus facile à dégrader en premier temps, puis s'adapte à d'autre source d'énergie, la reprise de la phase exponentielle s'appelle la Diauxie. Dans un milieu contenant du glucose et du lactose, les bactéries vont utiliser en premier le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose est consommé, les bactéries utiliseront le lactose et initieront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence adaptatif.

6. Le taux de croissance $\mu = \Delta \text{Ln}(x) / \Delta t$

Selon le graphe, on calcule μ à partir de la phase linéaire exponentielle

$$\mu = -0.296 - (-1.178) / 150 - 90$$

$$\mu = 0.882 / 60$$

$$\mu = \mathbf{0.0147 \text{ min}^{-1}}$$

Le temps de génération $g = \text{Ln}(2) / \mu$

$$g = 0.693 / 0.0147$$

$$g = \mathbf{47 \text{ min.}}$$

III. Les Facteurs environnementaux affectant la croissance des microorganismes

III.1. Effet de l'oxygène

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

- Les bactéries **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau.
- Les bactéries **microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air.
- Les bactéries **aéro-anaérobies** facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.
- Les bactéries **anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. La totalité de l'énergie est produite par **fermentation**.

III.2. Effet de la température

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance.

- Bactéries **mésophiles** : la température de croissance est comprise entre 20°C et 45°C avec un optimum entre 30°C et 37°C, (Ex : bactéries commensales de l'homme et des animaux, et toutes les bactéries pathogènes. Les bactéries saprophytes responsables de la dégradation de la matière organique.
- Bactéries **thermophiles** (Ex. : *Thermus aquaticus*) : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C. De même, les bactéries peuvent être distinguées selon leur aptitude à croître en fonction de la température.

- Bactéries **hyperthermophiles** (Ex. : *Archaea*) : la température de croissance est supérieures à 80°C.
- Bactéries **psychrophiles**: températures proches de 0°C (optimum à 10-15°C), très répandues dans les milieux naturels, ce sont surtout des bacilles à gram – asporulés (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, levures et moisissures)
Conséquence : prolifération dans des aliments si la chaîne du froid n'est pas respectée (stockage, congélation – décongélation, ...).
- Bactéries **cryophiles** (Ex. : *Aéromonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec un optimum de croissance proche des bactéries mésophiles.

III.3. Effet du pH

Le pH (concentration en ion hydrogène [H⁺]) de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines des lacs).

Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins.

On distingue :

- Les bactéries **neutrophiles** se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7.
- Les bactéries **alcalophiles** préfèrent les pH alcalins : cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*.
- Les bactéries **acidophiles** se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

III.4. La pression osmotique

Sauf exception, les bactéries ne sont pas très sensibles aux variations de pression osmotique grâce à leur paroi, selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue :

Tableau 7 : effet de la pression osmotique sur les microorganismes

Dénomination	Se développent à	Exemples et remarques
Non halophiles	Croissance en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M	Exemples : Entérobactéries, Pseudomonas
Halophiles	Ne se développe que dans des milieux très salés (au moins 10 %)	Exemples : <i>Vibrionaceae</i> , <i>S.aureus</i> : halophiles modérés Certaines bactéries halophiles extrêmes peuvent se développer à la surface des cristaux de sel marin. Le comportement des microorganismes vis à vis de la pression osmotique est considéré de très près dans le domaine agroalimentaire pour éviter la dégradation des salaisons.

III.5. Effet de l'eau libre

La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. **L'activité de l'eau** (A_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

● Présence de sels

- Les **bactéries halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement.
- Les **bactéries halotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

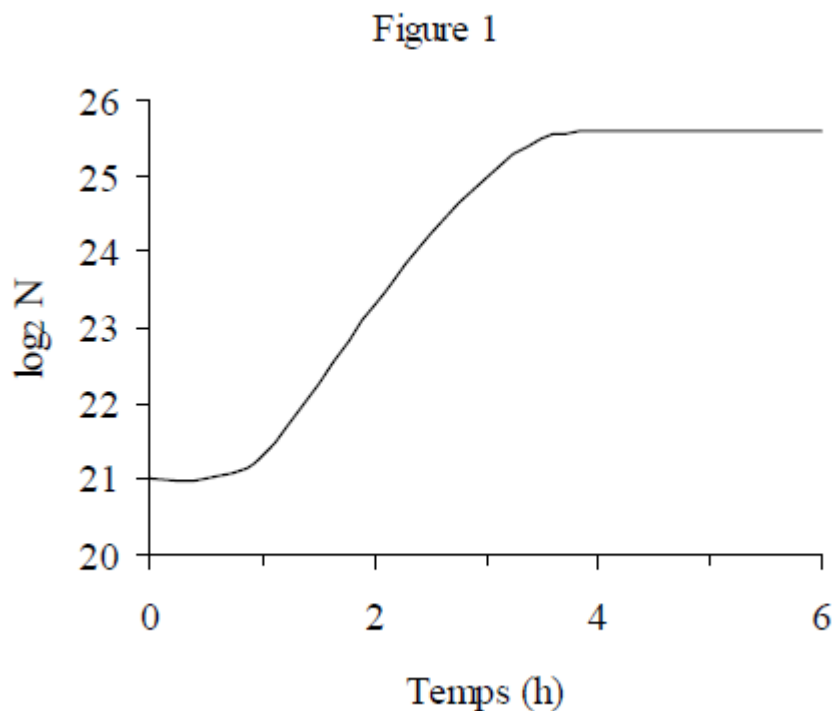
● Présence de sucres

- Les **bactéries osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance.
- Les **bactéries osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
- Les **bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

Exercice

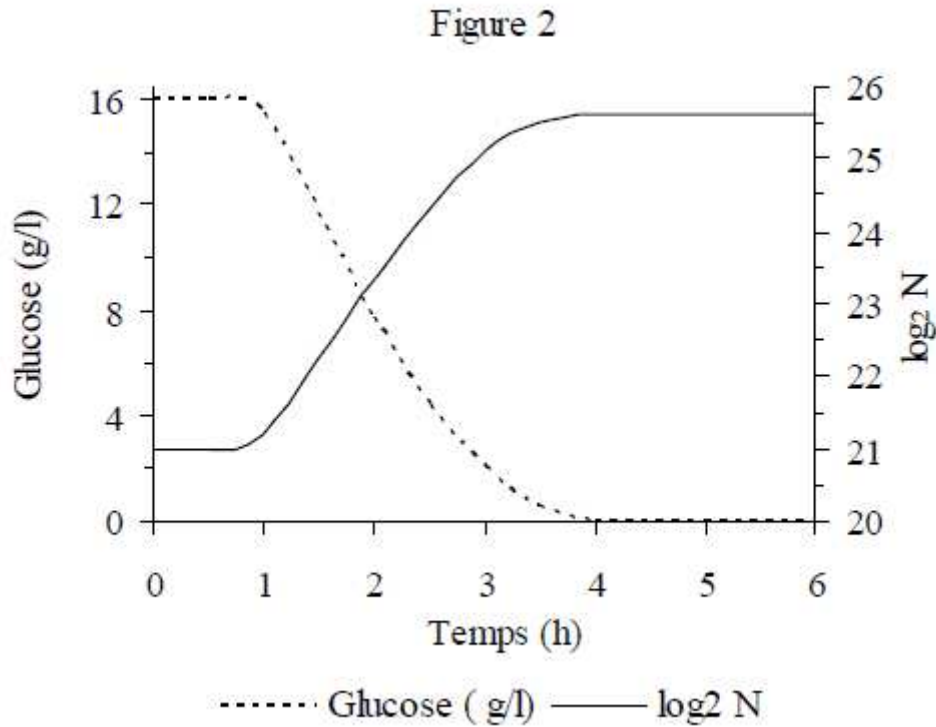
I) Une souche de *Pseudomonas* isolée à partir du sol est capable de se développer sur le milieu suivant : Glucose : 16g/l ; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 1g/l ; K_2HPO_4 : 7g/l ; KH_2PO_4 : 3g/l ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1g/l.

Pour étudier la croissance bactérienne de cette souche, ce milieu a étéensemencé à partir d'une culture de 24 h de cette souche sur gélose nutritive puis incubé dans les conditions optimales de température et de pH. L'évolution du nombre de bactéries en fonction du temps est schématisée sur la figure 1.



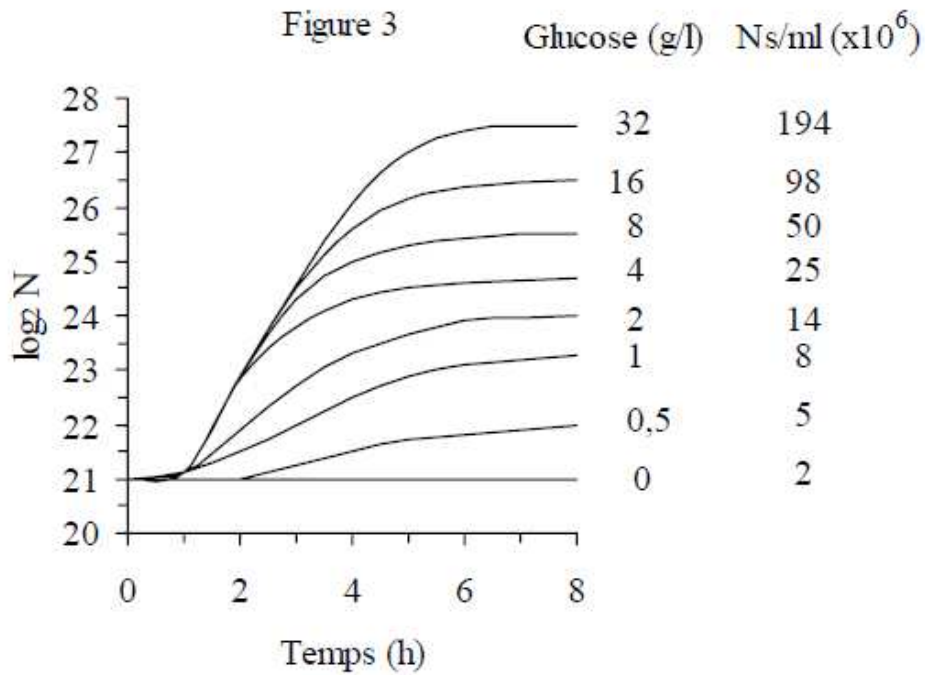
- 1) Délimiter sur le graphe ci-dessus les différentes phases de croissance ; interprétez et qualifiez chacune d'elles.
- 2) Déterminez la valeur numérique de trois paramètres nécessaires et suffisants pour caractériser cette croissance.
- 3) D'après les conditions expérimentales, de quoi dépend la 1ère phase de la courbe ?

- 4) Expliquez la troisième phase de la courbe à partir de la corrélation entre la croissance bactérienne et la consommation du glucose (figure 2).



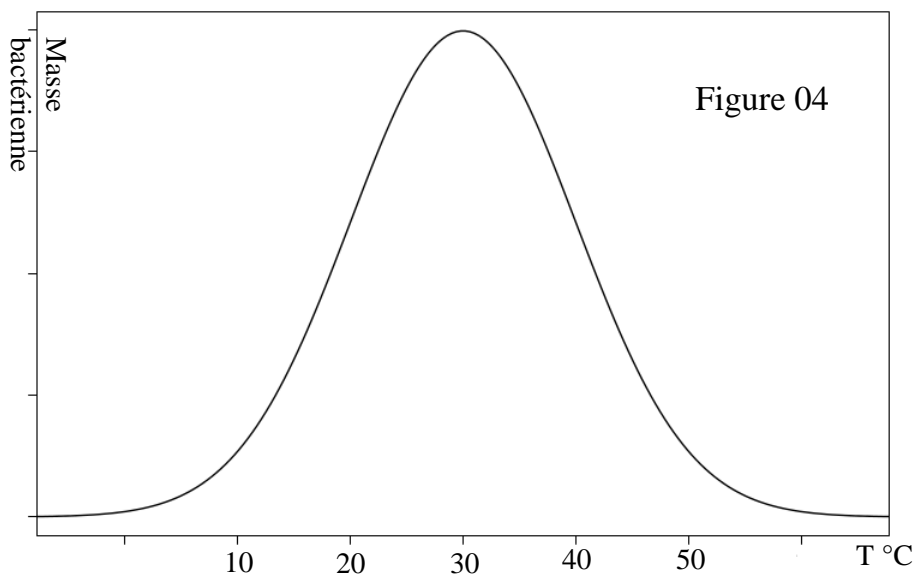
II) On répète la même expérience de croissance avec la même souche et sur le même milieu de culture, mais en présence de différentes concentrations de glucose.

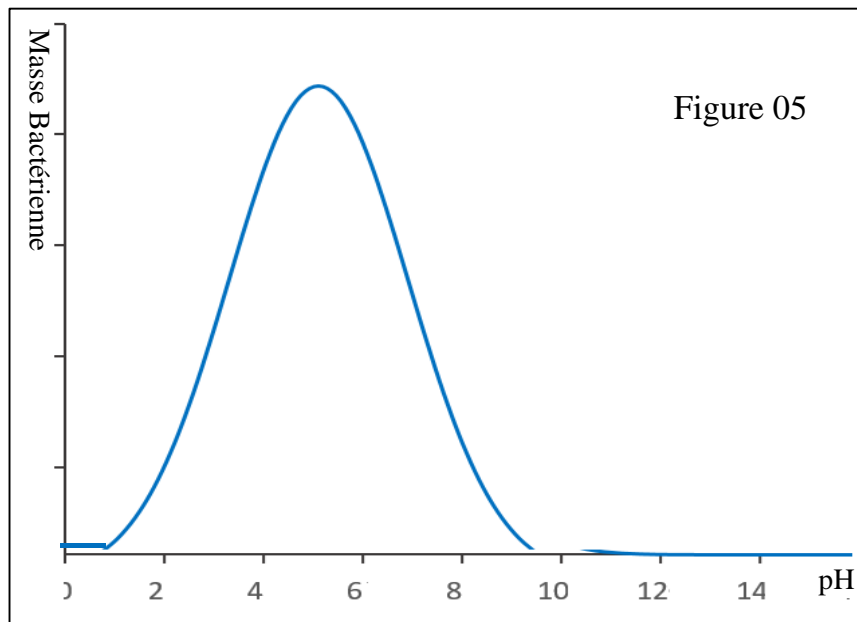
Les différentes courbes de croissance sont représentées sur le même graphe dans la figure 3.



- 1) Comparer la croissance totale ($N_s - N_0$) et le taux de croissance μ max pour les concentrations 32 et 4 et 0,5 mg/ml.

III) Une optimisation de la croissance bactérienne a été effectuée en changeant les températures et le pH de croissance, les résultats sont mentionnées sur les figures 4 et 5.

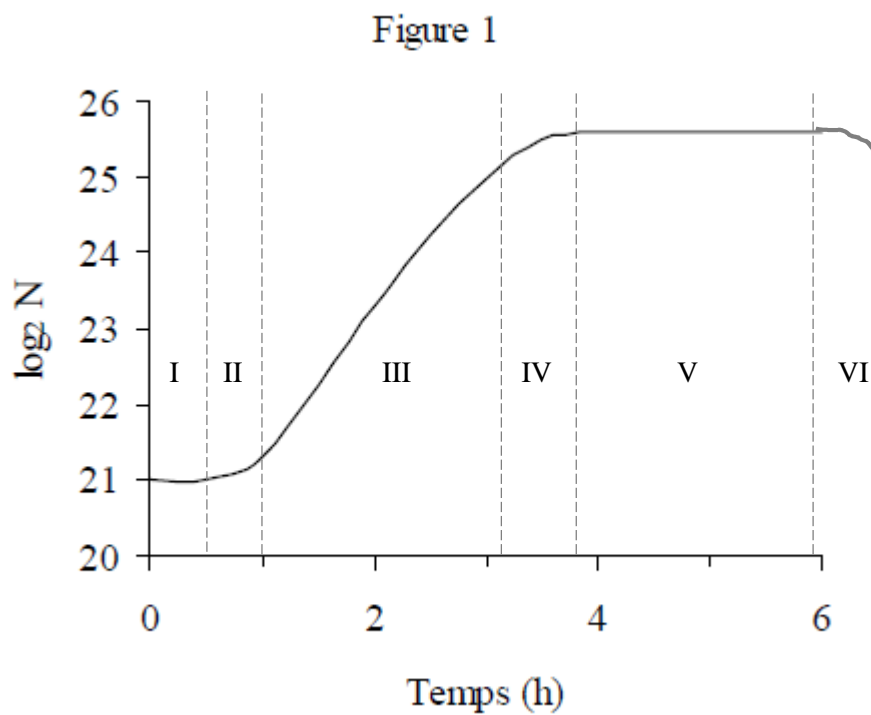




- Interpréter les résultats en indiquant le type de cette souche bactérienne.

Corrigé

1- Délimitation des phases de croissance (Figure 1).



➤ **Interprétation :**

Phase I : Phase de latence :

- Adaptation au nouveau milieu. Préparation de la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation des nouveaux substrats.
- Détoxification du milieu.
- Pas de division bactérienne ($\mu = \text{zéro}$).

Phase III : Phase expérimentale :

- Les bactéries sont dans leur état physiologique et métabolique optimum. D'où un maximum de synthèses surtout d'ADN et par conséquent un maximum de divisions bactérienne. Le taux de croissance est maximum (μ_{max}). Ce paramètre qui permet de caractériser la croissance doit être calculé au niveau de cette phase (pente de la courbe).

Phase V : Phase stationnaire :

- "Arrêt" de croissance. "Arrêt" de divisions bactérienne ($m = \text{zéro}$).
- Les conditions de culture commencent à devenir défavorables.

Phase VI : Phase de déclin :

- Les conditions de culture sérieusement défavorables.
- Il y a mort des bactéries ($\mu < \text{zéro}$).
- Existence possible de formes de résistance (spores) pour les souches qui sporulent.

Phase II : Phase d'accélération :

- Phase intermédiaire entre la phase de latence et la phase exponentielle.
- Il y a accélération du rythme de division bactérienne (μ passe de zéro et tend vers μ_{max}).

Phase IV : Phase de ralentissement :

- Phase intermédiaire entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (μ passe de μ_{max} et tend vers zéro)..
- Il y a ralentissement du rythme de division bactérienne.

3) La phase de latence dépend :

- De la nature et la richesse du milieu. Pour un milieu riche (naturel) cette phase est courte ou inexistante alors que pour un milieu pauvre (synthétique) elle est longue. Dans le cas de l'exercice la phase de latence est justifiée par le passage d'un milieu riche et naturel (gélose nutritive) à un milieu plus pauvre et synthétique (milieu M).
- Des différentes enzymes synthétisé par la bactérie pour dégrader les molécules nutritionnelles du milieu, ce qui exige une période de temps pour exprimes les différents gènes qui codent ces protéines enzymatiques.

4) La phase stationnaire est conditionnée par :

- L'épuisement du milieu en nutriments tels que la source de carbone (ex : Glucose dans ce cas).
- L'accumulation de produits toxiques qui ne sont pas nécessairement des déchets mais peuvent être tout simplement des produits métaboliques (ex : éthanol pour la fermentation alcoolique) qui deviennent inhibiteurs à partir d'une certaine concentration.
- Le développement d'un équilibre physico-chimique défavorable. Ex : variation du pH du milieu, variation de l'oxygénation du milieu ...etc.
- Le remplissage du volume du récipient disponible (il n'y a plus d'espace pour les bactéries).

5) Les trois paramètres nécessaires et suffisants pour caractériser la croissance sont :

Le taux de croissance maximum (μ_{max}), g, et la croissance totale ($N_s - N_0$).

- μ_{max} est calculé au niveau de la phase exponentielle (Figure 1) par projection sur les axes du graphe. $\mu_{max} = \log_2 N_2 - \log_2 N_1 / t_2 - t_1$. Sa valeur numérique est environ 2 heure⁻¹.
- $g = 1 / \mu_{max} = 1 / 2 = 0,5$ heure ou 30 minutes.

- $N_s - N_0$: Se calcule à partir des valeurs sur la Figure 1. N_s = nombre de bactéries en phase stationnaire et N_0 = nombre de bactéries initiales.

Sachant que si $\log_2 N = x$ donc $N = 2^x$.

$$N_0 = 2^{21} = 2 \cdot 10^6 \text{ u.f.c / ml}$$

$$N_s = 2^{25,5} = 47,45 \cdot 10^6 \text{ u.f.c / ml}$$

$$N_s - N_0 = (47,45 - 2) \cdot 10^6 = 45,45 \cdot 10^6 \text{ u.f.c / ml}$$

II)

- 1) Comparaison de la croissance totale ($N_s - N_0$) et μ_{\max} pour les concentrations de glucose de 0,5, 4 et 32 g/l.

[glucose] (g/l)	μ_{\max} (h^{-1})	($N_s - N_0$) (ufc/ml)
0.5	$21.5 - 21/2 = 0.25$	$(5-2) \cdot 10^6 = 3 \cdot 10^6$
4	$25 - 23/1 = 2$	$(25-2) \cdot 10^6 = 23 \cdot 10^6$
32	$25 - 23/1 = 2$	$(194-2) \cdot 10^6 = 192 \cdot 10^6$

- Dans les conditions expérimentales, la croissance totale (biomasse produite) est directement proportionnelle à la concentration du glucose : Plus la concentration du glucose augmente plus la quantité de biomasse produite augmente.

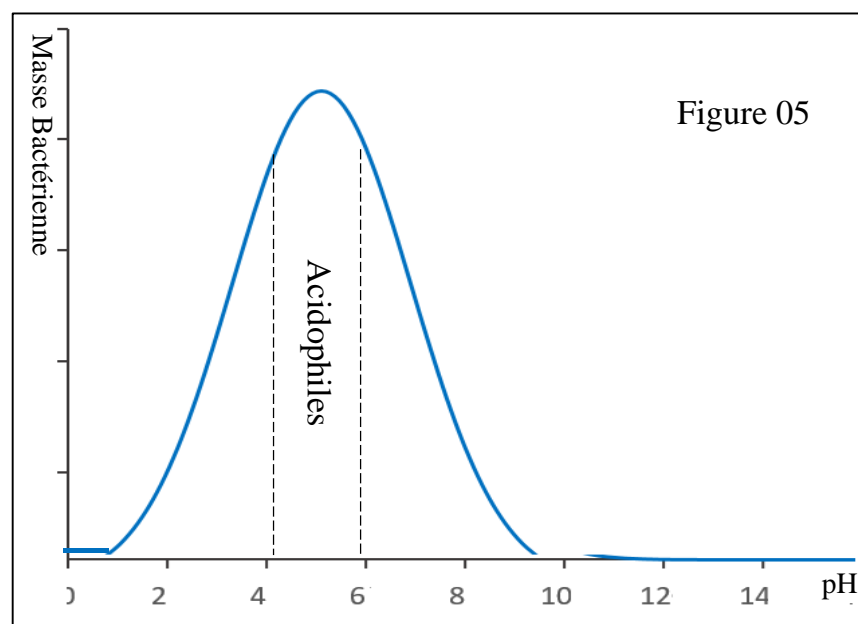
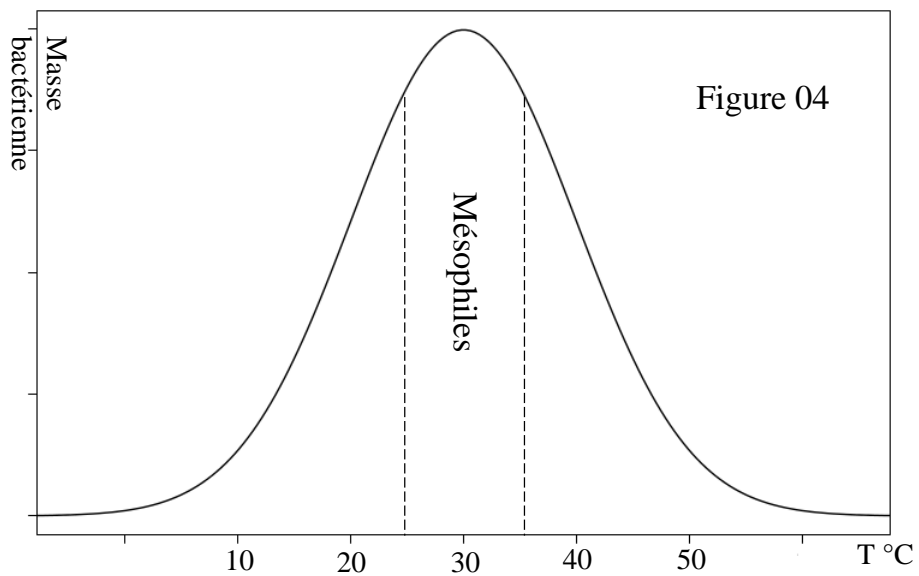
- Pour μ_{\max} et donc g , l'évolution des courbes $\mu_{\max} = f([\text{Glucose}])$ et $g = f([\text{Glucose}])$ sur la figure 4 montre l'existence de 2 phases :

- **Phase I** : - $0 \text{ g/l} < [\text{Glucose}] < 4 \text{ g/l}$.
 - μ_{\max} augmente et g diminue lorsque la concentration du glucose augmente.
 - Le glucose est donc considéré ici comme facteur limitant la croissance.
- **Phase II** : - $[\text{Glucose}] \geq 4 \text{ g/l}$.
 - μ_{\max} constant et maximum et g constant et minimum lorsque la concentration du glucose augmente.

- Le glucose n'est donc pas considéré ici comme facteur limitant la croissance.

2) La valeur seuil de limitation est la concentration de glucose de 4 g/l.

III)



Selon le graphe qui représente la croissance bactérienne en fonction des variations de températures, on remarque que cette souche est très actif à un intervalle de $[25 - 35]^{\circ}\text{C}$, et avec un optimum de 30°C , ce qui classe cette bactérie comme une mésophile, d'où la température affecte sa croissance.

Alors que l'acidité est le milieu favorable pour la bonne croissance de la souche, avec des pH varient entre 4 et 6, et avec un optimum de 5, ce type microbien est nommé acidophile, il donne une très bonne croissance à des pH bas. Ce pH est idéal pour le fonctionnement des différents enzymes ce cette souche.

Partie III

Identification bactérienne

I. Identification biochimique des bactéries

Les bactéries isolées de leurs environnements sont souvent transférées au laboratoire pour les purifier, les identifier, et les utiliser dans diverses applications.

L'observation morphologique après la coloration de Gram, sélectionne deux groupes bactériens, les bactéries à Gram positif, et les bactéries à Gram négatif.

Cette classification est suivie par des tests qui ont pour but d'identifier une souche bactérienne pure, ces tests sont de nature biochimique.

I.1. Test de catalase.

Ce test est utilisé pour identifier les organismes qui produisent l'enzyme catalase. Cette enzyme détoxifie le peroxyde d'hydrogène en le décomposant en eau et en oxygène. Les bulles résultant de la production d'oxygène gazeux indiquent clairement un résultat positif pour la catalase.

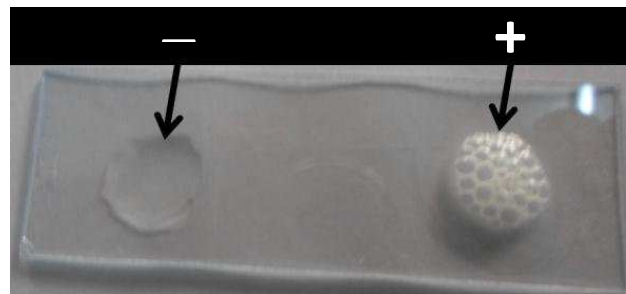
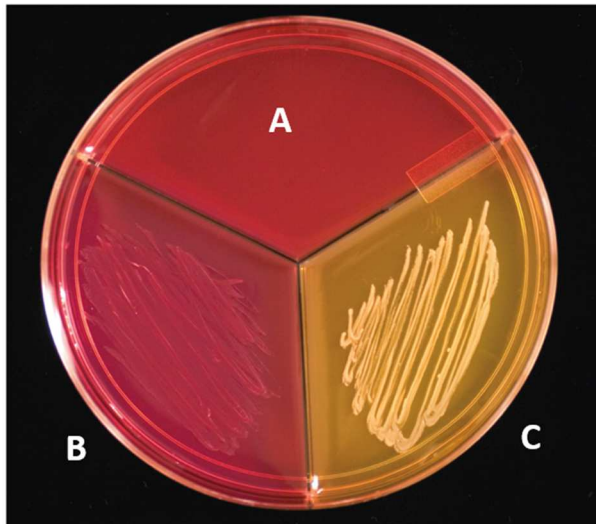


Figure 12 : résultat de test de catalase

I.2. Ensemencement sur gélose Mannitol-sel.

Cette gélose est sélectif et différentiel, elle sélectionnera les microorganismes ayant la capacité de vivre dans des milieux à forte concentration en sel (souvent NaCl). Les bactéries capables d'utiliser le mannitol comme source de carbone produiront des sous-produits acides issus de la fermentation qui abaisseront le pH du support en virant la couleur de l'indicateur du rouge vers le jaune.



A et B : Mannitol –
C : Mannitol +

Figure 13 : ensemencement sur gélose Mannitol-sel

I.3. Utilisation du Citrate.

L'enzyme citrase hydrolyse le citrate en acide oxaloacétique et acide acétique. L'acide oxaloacétique est ensuite hydrolysé en acide pyruvique et CO_2 . Si le CO_2 est produite, il réagit avec des composants du milieu pour produire un composé alcalin (par exemple Na_2CO_3). Le pH alcalin fait passer l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) du vert au bleu.

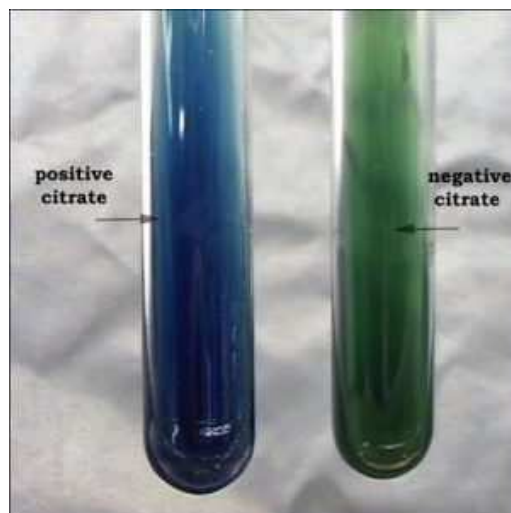


Figure 14 : ensemencement sur gélose citrate de Simons.

I.4. Test d'hydrolyse de l'amidon.

Ce test est utilisé pour identifier les bactéries capables d'hydrolyser l'amidon à l'aide des enzymes α -amylase et oligo-1,6-glucosidase.

Pour interpréter les résultats du test d'hydrolyse de l'amidon, il faut ajouter de l'iode à la gélose. L'iode réagit avec l'amidon pour former une couleur marron foncé. Ainsi, l'hydrolyse de l'amidon créera une zone claire autour de la colonie bactérienne.



Figure 15 : ensemencement sur gélose à l'amidon

I.5. Test d'oxydase

Ce test est utilisé pour identifier les microorganismes contenant l'enzyme cytochrome oxydase (importante dans la chaîne de transport des électrons). Dans le test oxydase, des donneurs et accepteurs d'électrons artificiels sont fournis. Lorsque le donneur d'électrons est oxydé par le cytochrome oxydase, il devient violet foncé. Ceci est considéré comme un résultat positif.

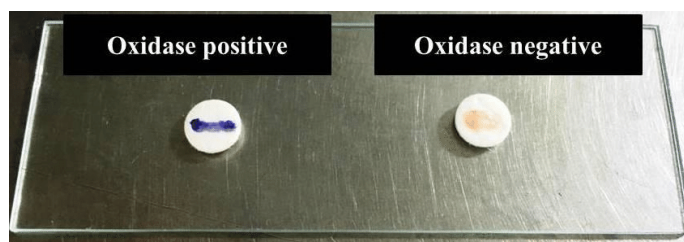
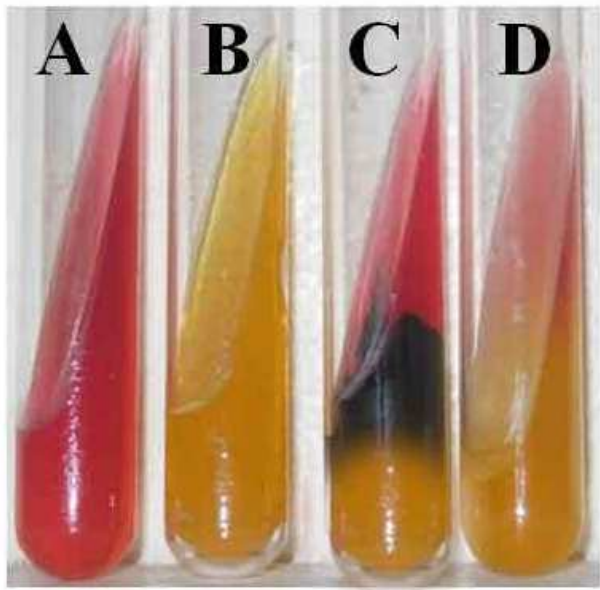


Figure 16 : résultat de test d'oxydase

I.6. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

C'est un milieu glucosé saccharosé lactosé peptoné, contenant du citrate de fer ammoniacal et une source de soufre. Il est très utilisé dans l'identification des *enterobacteriaceae*.

La souche microbienne utilise en premier temps le glucose, puis le saccharose ou le lactose en 2^{ém} stade, puis les peptones en 3^{ém} stade. Comme elle peut produire de l' H_2S .



A : Milieu négatif (couleur rouge).

B : Gluc + ; Sacc/Lac + (tous jaune)

C : Gluc + ; Sacc/Lac - ; H_2S + (culot jaune ;noircissement ; pente rouge)

D : Gluc + ; Sacc/Lac - ; H_2S - (culot jaune ; pente rouge)

Figure 17 : ensemencement de la gélose TSI.

I.7. Métabolisme des glucides

- **Auxanogramme.**

Permet de caractériser l'aptitude à la croissance d'une bactérie ou d'autres micro-organismes en milieu synthétique supplémenté avec divers substrats, sources uniques de carbone et d'énergie. Cette procédure est utile au diagnostic de certaines bactéries en routine.

I.8. Le test ONPG

Il consiste à rechercher la présence de **β -galactosidase**. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre β -galactoside : l'ortho-nitro-phényl-

galactoside (**ONPG**) qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un **produit coloré** (l'orthonitrophénol: **ONP**). Ceci est possible car la β -galactosidase n'est pas spécifique du lactose, mais des β -galactosides.

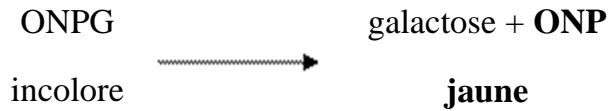


Figure 18 : résultat de test d'ONPG.

I.9. Test d'hydrolyse de la gélatine

Le test d'hydrolyse de la gélatine est utilisé pour détecter la capacité d'un organisme à produire de la gélatinase (enzyme protéolytique) liquéfiant de la gélatine. L'hydrolyse de la gélatine indique la présence de gélatinases.



A : gélatinase – (gélatine non liquéfier)

B : Gélatinase + (gélatine liquéfier)

Figure 19 : ensemencement de la gélatine.

I.10. Test d'uréase

L'urée est un diamide d'acide carbonique. Il s'hydrolyse en libérant de l'ammoniac et du dioxyde de carbone. De nombreux organismes, en particulier ceux qui infectent les voies urinaires, possèdent une enzyme uréase capable de séparer l'urée en présence d'eau pour libérer de l'ammoniac et du dioxyde de carbone.

L'ammoniac se combine avec le dioxyde de carbone et l'eau pour former du carbonate d'ammonium, ce qui rend le milieu alcalin, faisant passer le rouge phénol indicateur de sa couleur jaune orangée initiale au rose vif.

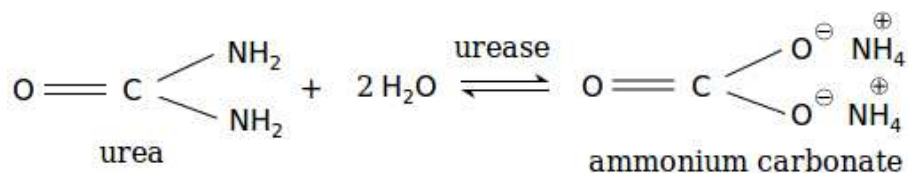


Figure 20 : résultat de test de l'uréase.

II. Identification génotypique des bactéries

Les méthodes traditionnelles d'identification microbienne exigent la reconnaissance des différences de morphologie, de croissance, d'activité enzymatique et de métabolisme pour définir les genres et les espèces. Les méthodes de séquençage complet et partiel des gènes de l'ARNr 16S sont devenues des outils utiles pour l'identification de microorganismes phénotypiquement inconnus.

L'identification moléculaire des microorganismes se repose sur trois étapes principales :

- Extraction de la molécule d'ADN.
- Amplification de la molécule d'ADN.
- Séquençage des gènes.

II.1. Extraction de la molécule d'ADN.

De nombreuses techniques différentes sont disponibles pour isoler l'ADN génomique à partir de cellules bactériennes ; Les étapes courantes impliquant l'isolement de l'ADN comprennent la lyse de cellules, suivie de l'élimination des protéines, des glucides, de l'ARN, etc. une combinaison appropriée d'enzymes (lysozyme) et de détergents (SDS) sont utilisés pour digérer la paroi et la membrane cellulaire.

Des Kits de purification sont utilisés pour séparer la molécule d'ADN des autres composants cellulaires, puis une électrophorèse sur gel d'Agarose est effectuée pour confirmer la pureté de la suspension d'ADN obtenue.

II.2. Amplification de la molécule d'ADN.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est considérée comme l'une des plus importantes inventions méthodologiques en biologie moléculaire. Il est conçu pour permettre l'amplification sélective d'une ou plusieurs séquences d'ADN cible spécifiques dans une collection hétérogène de séquences d'ADN (par exemple, l'ADNr 16S). En PCR, l'ADN cible est amplifié de manière exponentielle en répétant trois étapes principales :

- La dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin.
- Hybridation des amorces sur les séquences cibles monocaténares complémentaires.
- Extension des amorces dans la direction 5' à 3' par une ADN polymérase thermostable pour produire des molécules d'ADN à double brin.

Le nombre de copies de molécules d'ADN est doublé à chaque étape d'extension.

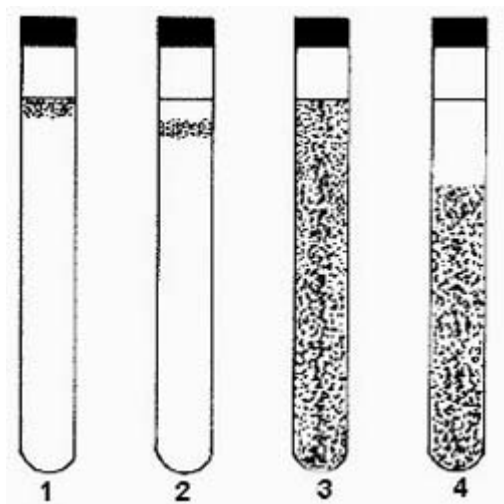
II.3. Séquençage.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Actuellement, la plupart du séquençage d'ADN est réalisée par la méthode de Sanger. Cette technique utilise la réaction de polymérisation de l'ADN avec une enzyme (anciennement le fragment de Klenow) « la sequenase » synthétisée complètement artificiellement et des didésoxyribonucléotides (ddNTP).

Étant donné une séquence introduite par l'utilisateur, BLAST permet de retrouver rapidement dans des bases de données, les séquences répertoriées ayant des zones de similitude avec la séquence d'entrée. Cette méthode est utilisée pour trouver des relations fonctionnelles ou évolutives entre les séquences et peut aider à identifier les membres d'une même famille de gènes.

Exercice

Après ensemencement par pique centrale d'une gélose Viande-Foie, le résultat de 24 heures d'incubation de 04 souches différentes a montré les résultats suivants.



1. De quoi il s'agit ce test.
2. Interpréter cette figure.

Corrigé

1. Il s'agit d'un test d'identification bactérien pour définir le type respiratoire de la bactérie. Pour cela, on ensemence les bactéries dans un tube droit contenant un milieu liquide. Après croissance, on observe l'apparition d'un **trouble qui se développe à un niveau caractéristique du type respiratoire.**

2. Dans la situation de la figure,

Les bactéries en **1** sont. **aérobies strictes**

Les bactéries en **2** sont **microaérophiles.**

Les bactéries en **3** sont. **aéroanaérobies**

Les bactéries en **4** sont. **Anaérobies strictes**

Exercice

Les produits d'identification API (**Analytical Profile Index**) sont des kits de test permettant d'identifier les levures et les bactéries Gram positives et Gram négatives.

- Expliquez ce test.

Corrigé

- Les Tests API assurent des identifications précises basées sur de vastes bases de données et constituent des systèmes de test normalisés et faciles à utiliser.

- Les kits comprennent des bandelettes contenant jusqu'à 20 tests biochimiques miniatures rapides, sûrs et faciles à réaliser.
- **API (Analytical Profile Index) 20E** est un panel biochimique d'identification et de différenciation des membres de la famille des *Enterobacteriaceae*.
- Il s'agit donc d'une méthode bien établie d'identification manuelle des micro-organismes au niveau des espèces.

Principe

Dans l'API 20E, la bande contient vingt mini-chambres d'essai contenant un milieu déshydraté ayant des compositions définies chimiquement pour chaque essai. Ils détectent généralement l'activité enzymatique, principalement liée à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines ou des acides aminés par les organismes inoculés.

Une suspension bactérienne est utilisée pour réhydrater chacun des puits. Pendant l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Tous les résultats de tests positifs et négatifs sont compilés pour obtenir un numéro de profil, qui est ensuite comparé aux numéros de profil dans un livre de codes commercial (ou en ligne) afin de déterminer l'identification de l'espèce bactérienne.

Le kit de test permet les tests suivants :

1. **ONPG** : recherche de l'enzyme β -galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl-bD-galactopyranoside
2. **ADH** : décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase
3. **LDC** : décarboxylation de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase
4. **ODC** : décarboxylation de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase
5. **CIT** : utilisation du citrate comme seule source de carbone
6. **H₂S** : production de sulfure d'hydrogène
7. **URE** : test de l'enzyme urease

8. **TDA** (Tryptophane désaminase): détection de l'enzyme tryptophane désaminase: Réactif- Chlorure Ferrique.
9. **IND** : production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase. Réactif - réactif de Kovac.
10. **VP**: test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétyl méthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol
11. **GEL** : test pour la production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine
12. **GLU** : fermentation du glucose (sucre hexose)
13. **MAN**: fermentation du mannose (sucre hexose)
14. **INO**: fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique)
15. **SOR**: fermentation du sorbitol (alcool sucre)
16. **RHA**: fermentation du rhamnose (sucre méthyl pentose)
17. **SAC**: fermentation du saccharose (disaccharide)
18. **MEL**: fermentation du mélibiose (disaccharide)
19. **AMY**: fermentation de l'amygdaline (glycoside)
20. **ARA**: fermentation de l'arabinose (sucre pentose)

Interprétation des résultats

1. Pour certains compartiments, le changement de couleur peut être lu immédiatement après 24 heures, mais pour certains réactifs, il faut y ajouter des réactifs avant toute interprétation.
2. Ajouter les réactifs suivants à ces compartiments spécifiques :
 - **TDA**: Mettez une goutte de chlorure ferrique
 - **IND**: Mettez une goutte de réactif de Kovac
 - **VP**: Mettez une goutte de KOH à 40% (réactif VP 1) et une goutte de VP Réactif 2 (α -Naphthol).
3. Obtenez l'Échelle de lecture de l'API (nuancier) en marquant chaque test comme positif ou négatif sur le couvercle du plateau. Les puits sont délimités en triplets par des triangles noirs pour lesquels des scores sont attribués.

4. Additionnez les scores pour les puits positifs uniquement dans chaque triplet.
5. Trois réactions de test sont additionnées à la fois pour donner un numéro à 7 chiffres, qui peut ensuite être recherché dans le livre de codes. Le score le plus élevé possible pour un triplet est 7 (la somme de 1, 2 et 4) et le plus bas est 0.
6. Identifier l'organisme en utilisant le catalogue API ou apiweb (en ligne)

Tous les tests sont négatifs



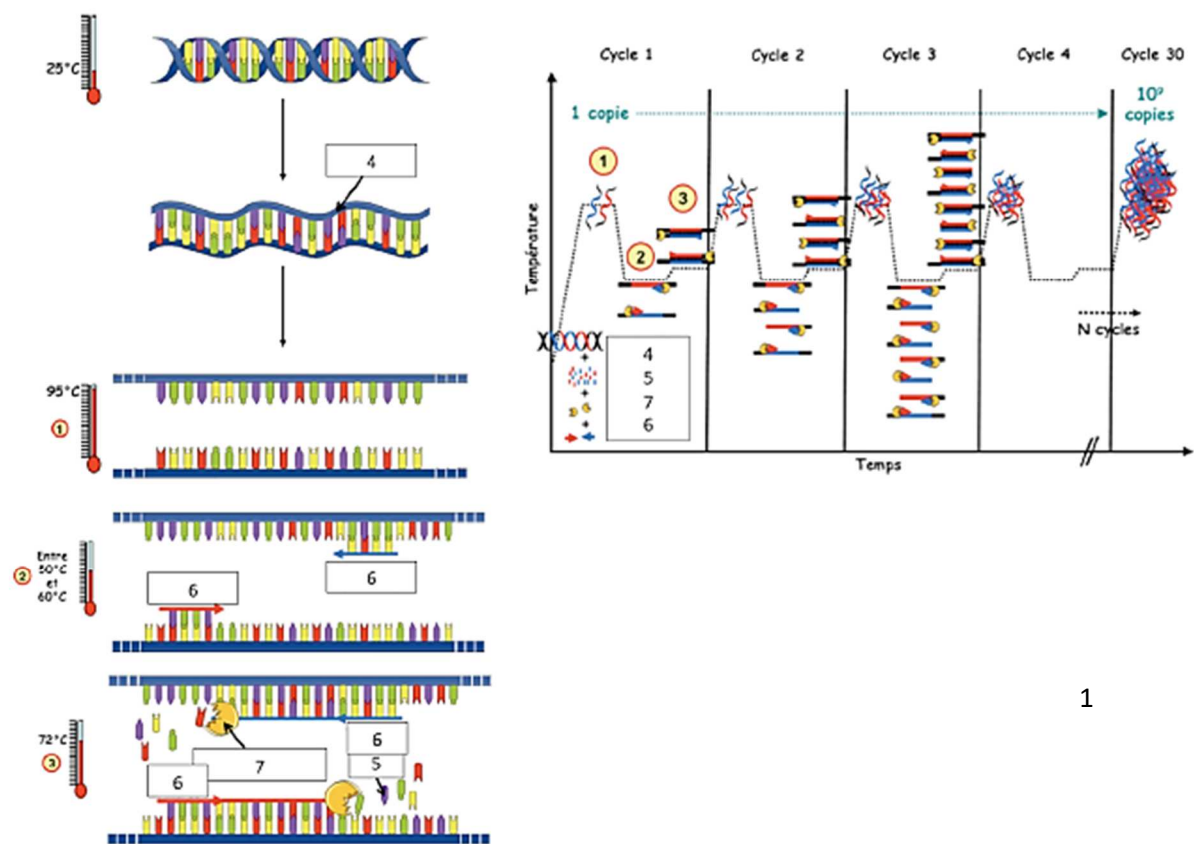
Tous les tests sont positifs



Triad	I			II			III			IV			V		VI		VII		oxidase		
Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Reaction	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Point	1	2	4	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	2	4	0	0	4	1	0	4
Add	7			0			3			1			6		4		5				
7-digital Code	7 0 3 1 6 4 5																				

Exercice

Titrez, légendez et expliquez ce qu'illustrent les figures suivantes. Dans quel cas utilise-t-on fréquemment cette technique ?



1

Corrigé

1 : Dénaturation (séparation des 2 brins de la molécule d'ADN) à 95°C pendant minute.

2 : Hybridation des amorces entre 50 et 60°C pendant 1 minute.

3 : Elongation par l'ADN polymérase à environ 72°C pendant 2 minutes.

→ Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR.

4 : Séquence d'ADN ciblée

5 : nucléotides (dNTPs)

6 : Amorces

7 : ADN polymérase.

La PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires. Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases:

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (95°C pendant 1 minute).
- Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques (entre 55 et 60°C pendant 1 minute). La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire.
- Une phase d'élongation par l'ADN polymérase à partir des amorces (à 70-72°C pendant 2 minutes).

Pour identifier une bactérie, les amorces utilisées dans cette technique sont en général fluorescentes.

Partie IV

Antibiogramme

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens sont importants pour confirmer la sensibilité aux agents antimicrobiens empiriques choisis ou pour détecter la résistance de différents isolats bactériens. Le traitement empirique continue d'être efficace contre certains agents pathogènes bactériens car aucun mécanisme de résistance n'a été observé, par exemple la sensibilité persistante à la pénicilline par *Streptococcus pyogenes*. Le test de sensibilité de chaque isolat est important chez les espèces pouvant posséder des mécanismes de résistance acquis.

- **Test de diffusion sur gélose**

- **Principe**

Cette méthode est basée sur l'effet des disques imprégnés de différents antibiotiques. Sur de la gélose préalablement inoculée avec la bactérie à tester, l'humidité aide l'antibiotique à se diffusé radialement vers l'extérieur à travers le milieu de gélose, produisant un gradient de concentration en antibiotique. La concentration de l'antibiotique au bord du disque est élevée et diminue progressivement à mesure que la distance du disque augmente jusqu'à un point où elle n'est plus inhibitrice pour l'organisme. Une zone ou un halo clair est formé autour du disque antibiotique après l'incubation si l'agent inhibe la croissance bactérienne.

- **Protocol et résultats**

- Le test est effectué en ensemencant en nappe un inoculum bactérien d'environ 1 à 2×10^8 UFC / mL de 18 heures d'incubation sur la surface d'une grande boîte de gélose Mueller-Hinton (150 mm de diamètre).
- Plusieurs disques d'antibiotiques en papier à concentration fixe, préparés commercialement, sont placés sur la surface de gélose inoculée. Les boîtes sont incubées pendant 16 à 24 heures à $30 - 37$ ° C avant la détermination des résultats.
- Les zones d'inhibition de la croissance autour de chacun des disques d'antibiotiques sont mesurées au millimètre. Le diamètre de la zone est lié à la sensibilité de l'isolat et à la vitesse de diffusion de la molécule antibiotique à travers le milieu gélosé.

- Les résultats du test de diffusion sur disque sont «qualitatifs», dans le sens de la sensibilité (c'est-à-dire sensible, intermédiaire ou résistante).
- Les diamètres de zone de chaque disque d'antibiotique sont interprétés selon les critères publiés par « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI, anciennement le Comité national des normes de laboratoire clinique ou NCCLS).

Tableau 11 : interprétation de taille de zones d'inhibition selon CLSI:

Sr. No.	Name of the antibiotic	Disc content	Diameter of zone of inhibition (mm) against MRSA (<i>S. aureus</i> ATCC 25923)		
			Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Sensitive (mm or more)
1.	Amoxicillin	30 mcg	19	–	20
2.	Ampicillin	10 mcg	28	–	29
3.	Cefpodoxime	10 mcg	17	18 - 20	21
4.	Cefuroxime	30 mcg	16	17 - 19	20
5.	Gentamicin	10 mcg	12	13 - 14	15
6.	Methicillin	5 mcg	5	10 - 13	14
7.	Oxacillin	1 mcg	10	11 - 12	13
8.	Penicillin G	10 units	28	–	29
9.	Rifampicin	5 mcg	16	17 - 19	20
10.	Streptomycin	10 mcg	11	12 - 14	15
11.	Teicoplanin	30 mcg	10	11 - 13	14
12.	Vancomycin	30 mcg	–	–	15

Les avantages

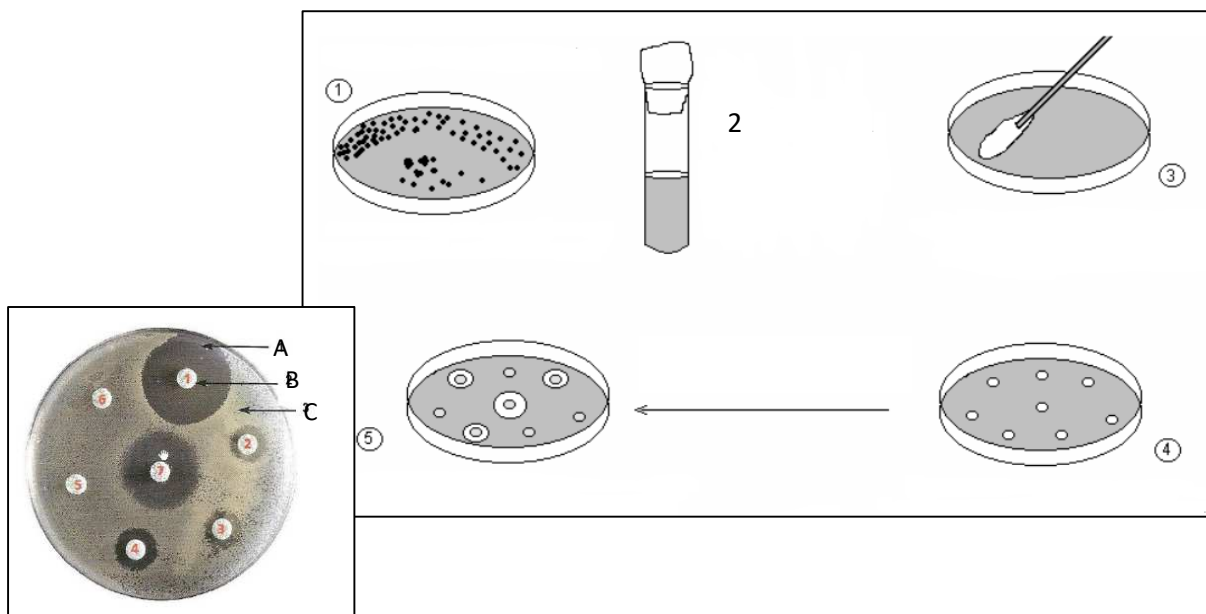
Les avantages de la méthode des disques sont la simplicité du test qui ne nécessite aucun équipement spécial, les résultats sont facilement interprétés par tous les cliniciens et la flexibilité dans la sélection des disques pour le test. C'est la moins coûteuse de toutes les méthodes de la sensibilité aux antibiotiques.

Les inconvénients

Les inconvénients du test du disque sont l'absence de mécanisation ou d'automatisation. Bien que toutes les bactéries à croissance lente ne puissent pas être testées avec précision par cette méthode, le test du disque a été normalisé pour le test des streptocoques, *Haemophilus influenzae* et *N. meningitidis* grâce à l'utilisation de milieux spécialisés, de conditions d'incubation et de critères d'interprétation de la taille de la zone.

Exercice

Expliquez le schéma suivant



Corrigé

1 : prélèvement de 2 ou 3 colonies morphologiquement identiques (à partir d'une souche pure).

2 : transfert des colonies à un bouillon puis incubation pendant 18 heures suivie d'un ajustement de la quantité cellulaire de la suspension bactérienne.

3 : encensement en surface de l'inoculum sur la gélose Muller-Hinton.

4 : les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose inoculée.

5. après 24 heures d'incubation, lecture de la boîte (zones d'inhibition)

A : Absence de bactérie autour de l'antibiotique

B : disque d'antibiotique (7 disques différents, 7 antibiotiques sont donc testés dans ce test).

C : Tapis bactérien

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : **bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.**

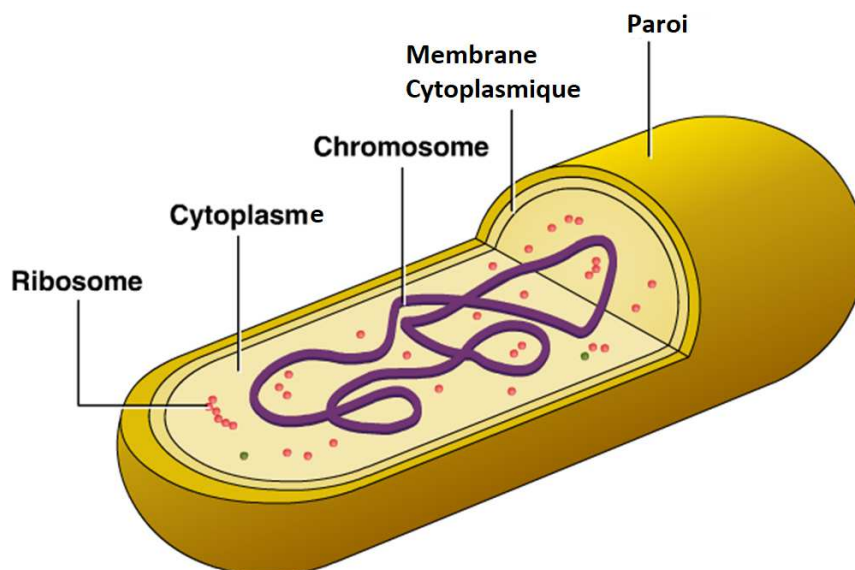
La bactérie testée est **sensible aux antibiotiques 1 et 7.**

Elle est **résistante aux antibiotiques 5 et 6.**

Et, intermédiaire pour les antibiotiques 2, 3 et 4.

Exercice

Sur la figure suivante, indiquez le mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques.



Corrigé

Tableau résume l'action des différentes familles des antibiotiques.

Site d'action	Mode d'action	Exemple d'antibiotique
Paroi	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la liaison des peptidoglycanes. • Inhibe la formation de la paroi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les Glycopeptides • Les Bétalactamines
Membrane cytoplasmique	Perturbation de la membrane par la liaison de l'ATB avec les phospholipides	<ul style="list-style-type: none"> • Les Polymixines
Chromosome	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'enroulement de l'ADN. • Inhibition de l'ARN polymérase. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les quinolones • Rifampicine
Cytoplasme	<ul style="list-style-type: none"> • Production des radicaux libres d'O₂ qui détruisent les protéines et l'ADN • Dépolarisation de la membrane interne 	<ul style="list-style-type: none"> • Nitroimidazole • Les lipopeptides
Ribosomes	<ul style="list-style-type: none"> • Empêche les protéines d'élongation, et bloque la synthèse des ribosomes • Inhibition de la synthèse des protéines 	<ul style="list-style-type: none"> • Macrolides et lincosamides • Chloramphénicol, tétracyclines

Les bactéries développent des mécanismes de résistance de 4 manières différentes :

- Synthèse des protéines qui protège les sites de fixation des antibiotiques.
- Mutation ou changement des sites de fixation des antibiotiques.
- Réduction de pénétration des antibiotiques à l'intérieur de la cellule.
- Production des pompes d'efflux pour éliminer l'antibiotique de l'intérieur de la bactérie avant qu'elles exercent leur effet.

Références bibliographiques

- Borel, T., A. M. Rose, M. Guillerm, F. Sidikou, S. Gerstl, A. Djibo, N. Nathan, S. Chanteau, and P. J. Guerin. 2006. High sensitivity and specificity of the Pastorex latex agglutination test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100:964-969.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19, 2009 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute
- **Gardès, J. C.** Stérilisation du matériel, *in* L'infection en chirurgie orthopédique. *Cahiers de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFECOT)*. 1990, n°37, p.47-57
- Jorgensen JH, Turnidge JD. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, *Manual of clinical microbiology*, 2007 9th ed. Washington, DC American Society for Microbiology (pg. 1152-72)
- Meunier-Goddik L, Sandra S. 2002. Liquid Milk Products / Pasteurized Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam: Academic Press 3, 1627-1632.
- Mitchell, S. L. et Berg, J. Sterilization in Slatter D., 2003. *Textbook of small animal surgery*, 3^e éd. Philadelphie: Saunders.. p. 155-162.
- Petti C. A., Polage C. R. Schreckenberger, P. 2005, The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods *journal of clinical microbiology*. DOI: 10.1128/JCM.43.12.6123-6125.2005.
- Tankeshwar *Bacteriology, Biochemical tests in Microbiology, Laboratory Diagnosis of Bacterial Disease* 6 .2014.